

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 07025764
PUBLICATION DATE : 27-01-95

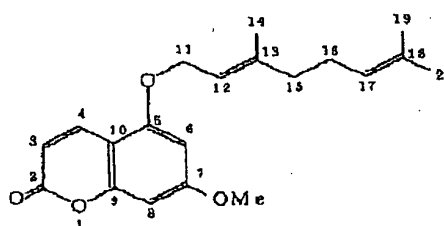
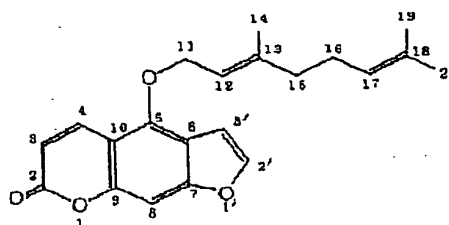
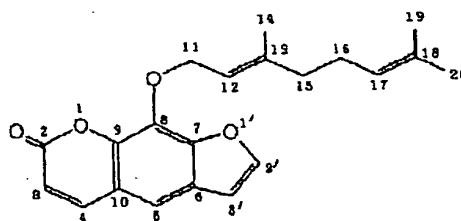
APPLICATION DATE : 12-07-93
APPLICATION NUMBER : 05193865

APPLICANT : POKKA CORP;

INVENTOR : MIYAKE YOSHIKI;

INT.CL. : A61K 31/365 A01N 43/90 A23L 3/3544
A61K 7/16 A61K 35/78 // C07D493/04

TITLE : ANTIBACTERIAL AGENT



ABSTRACT : PURPOSE: To obtain an antibacterial agent originated from natural resource, having excellent safety and active against pathogenic bacteria for dental caries, periodontosis, etc., by using geranoxypsoralen, etc., as an active component.

CONSTITUTION: This antibacterial agent contains 8-geranoxypsoralen of the formula I, 5-geranoxypsoralen of the formula II and/or 5-geranox-7-methoxycoumarin of the formula III as active components. The agent can be extracted, e.g. by leaving standing the peel of citrus fruit such as lemon in methanol for 3 days at 37°C.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-25764

(43) 公開日 平成7年(1995)1月27日

| (51) Int.Cl. ⁸ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|-------|---------|-----|--------|
| A 6 1 K 31/365 | A D Z | 9454-4C | | |
| A 0 1 N 43/90 | 1 0 1 | 9155-4H | | |
| A 2 3 L 3/3544 | | | | |
| A 6 1 K 7/16 | | 7252-4C | | |
| 35/78 | K | 8217-4C | | |

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-193865

(22) 出願日 平成5年(1993)7月12日

(71) 出願人 591134199

株式会社ボッカコーポレーション

愛知県名古屋市中区代官町35番16号

(72) 発明者 玉置 洋司

岐阜県各務原市鞆沼台8-71

(72) 発明者 加藤 隆行

愛知県名古屋市中区比良3-520

(72) 発明者 三宅 義明

愛知県豊田市枝下町平岩50番地

(74) 代理人 弁理士 戸田 親男

(54) 【発明の名称】 抗菌剤

(57) 【要約】

【構成】 LE-I (8-geranoxypsoralen)、LE-II (5-geranoxypsoralen) 及び/又は LE-III (5-geranox-7-methoxycoumarin) を有効成分とする抗菌剤。

【効果】 天然物由来で安全性が高く、虫歯菌や歯周病原増殖阻害剤として歯みがき、口内清浄剤、食品類に添加使用できるほか、防カビ剤として青果物等の防カビに使用できる。

(2)

特開平7-25764

1

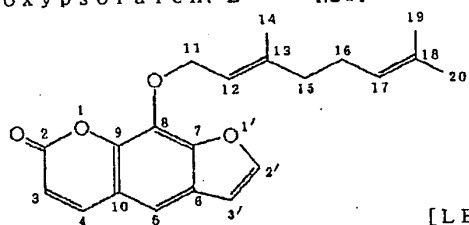
2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の化1、化2、及び又は、化3で示される8-ジェラノキシソラレン(8-geranoxypsoralen、LE-I)、5-ジェラノキシソラレン(5-geranoxypsoralen、L*

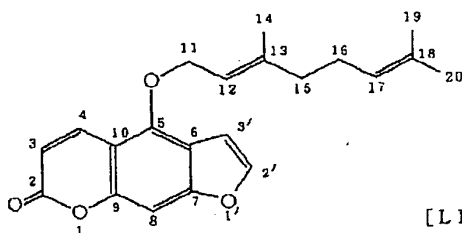
*E-II)、及び又は、5-ジェラノキシ-7-メトキシクマリン(5-geranoxo-7-methoxycoumarin、LE-III)を有効成分とすることを特徴とする抗菌剤。

【化1】



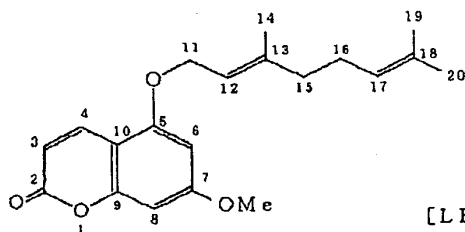
[LE-I]

【化2】



[LE-II]

【化3】



[LE-III]

【請求項2】 抗菌剤が虫菌菌、歯周病原菌に対する抗菌剤であることを特徴とする請求項1に記載の抗菌剤。

【請求項3】 抗菌剤が防カビ剤であることを特徴とする請求項1に記載の抗菌剤。

【請求項4】 抗菌剤が青果物の貯蔵・輸送時の防カビ剤であることを特徴とする請求項1に記載の抗菌剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、抗菌剤に関するものであり、更に詳細には、天然有機化合物を有効成分とする安全性の高いすぐれた抗菌剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来、天然物、特に柑橘類の果皮に由来し、抗菌力にすぐれ且つ安全性の高い抗菌性物質を単離、精製し、構造決定に成功した例は知られていない。

【0003】 一方、クマリン骨核を有する化合物であるソラレン(psoralen、すなわち、フロ[3, 2-g]クマリン、別名7H-フロ[3, 2-g][1]ベンゾピラン-7-オン)及びその誘導体が、微生物

(例えば虫菌菌、歯周病原菌や植物に寄生するカビ類)に対してすぐれた抗菌性を有することについては、特許はもとより、他の研究報告もなされていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 現在のところ、やむを得ず抗菌剤としては化学合成品が使用されているが、人体や環境に対する安全性の面で問題がある。そこで、当業界においては、安全性の高いすぐれた抗菌剤の開発が待望されている。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明は、上記した業界のニーズに応えるためになされたものであって、安全性重視の面から、天然物に着目した。

【0006】 そこで本発明者らは、天然物由来の抗菌性物質を求めて鋭意研究したところ、レモン、グレープフルーツなどの柑橘類の果皮に抗菌性物質が含まれることを確認したのである。そして、抗菌性物質を分離、精製するのに成功しただけでなく、3つの精製物質(LE-I、LE-II、LE-III)についてそれらの構造決定

にも成功し、そして更にこれらの精製物質のすぐれた抗菌性も確認し、遂に本発明の完成に至ったものである。

【0007】すなわち本発明は、LE-I、LE-II、及び/又はLE-IIIを有効成分とする抗菌剤に関するものである。これらLE物質は、柑橘類の果皮由来の天然物質であって、クマリン誘導体であり、構造決定の結果、LE-Iは8-ジェラノキシソラレン(8-geranoxypsoralen)、LE-IIは5-ジェラノキシソラレン(5-geranoxypsoralen)、LE-IIIは5-ジェラノキシ-7-メトキシクマリン(5-geranox-7-methoxycoumarin)と同定された。

【0008】これらLE物質は卓越した抗菌作用を示し、抗菌剤としてきわめて有用である。以下、LE物質の製造方法、構造決定、抗菌性について、その実施例を述べる。

【0009】

LE-I : 8-geranoxypsoralen

| | ¹ H NMR(a) | ¹³ C NMR(b) |
|----|---------------------------|------------------------|
| 2 | | 160.49 |
| 3 | 6.37(1H, d, J=9.5) | 114.68 |
| 4 | 7.76(1H, d, J=9.5) | 144.31 |
| 5 | 7.36(1H, s) | 113.18 |
| 6 | | 125.80 |
| 7 | | 148.74 |
| 8 | | 143.12 |
| 9 | | 143.93 |
| 10 | | 116.45 |
| 11 | 5.03(2H, d, J=7.0) | 70.06 |
| 12 | 5.60(1H, dt, J=7.0 & 1.0) | 119.41 |
| 13 | | 131.55 |
| 14 | 1.69(3H, bs) | 16.51 |
| 15 | 2.01(2H, m) | 39.54 |
| 16 | 2.01(2H, m) | 26.32 |
| 17 | 4.99(1H, m) | 123.74 |
| 18 | | 131.69 |
| 19 | 1.56(3H, s) | 17.62 |
| 20 | 1.64(3H, s) | 25.62 |
| 2' | 7.69(1H, d, J=2.5) | 146.58 |
| 3' | 6.81(1H, d, J=2.5) | 106.70 |

(a) CHCl₃ as 7.26ppm (CDCl₃, 270MHz)

(b) ¹³CHCl₃ as 77.0ppm (CDCl₃, 67.5MHz)

【0012】

【表2】

*【実施例1】ミキサーで粉砕したレモン搾り粕の果皮を、メタノールに37℃、3日間放置して抽出を行なった。これを、エバポレーターで濃縮し、濃縮物を水で希釈し、シリカゲルクロマトグラフィーに供したところ、活性物質は、樹脂に吸着された。これを、60%メタノールで、不純物を溶出し、次に、80%メタノールで溶出して、活性物質を含むサンプルを得た。分取HPLCでさらに分画し、活性を示す3画分が得られた。この3画分のメタノール溶液に水を徐々に添加することにより溶解度を下げ、加熱、冷却を繰り返して結晶化を行なった。この結晶化(再結晶)を繰り返して、3つの精製物質(LE-I, II, III)を得た。

【0010】これらのLE物質について、それぞれ¹H NMR及び¹³C NMR分析を行って、下記表1、表2、表3の結果を得た。

【0011】

【表1】

(4)

特開平7-25764

5
LE-II: 5-geranoxypsoralen

6

| | ¹ H NMR (a) | ¹³ C NMR (b) |
|----|---------------------------|-------------------------|
| 2 | | 161.29 |
| 3 | 6.28(1H, d, J=9.5) | 112.52 |
| 4 | 8.17(1H, dd, J=9.5 & 0.5) | 139.59 |
| 5 | | 148.95 |
| 6 | | 114.17 |
| 7 | | 158.10 |
| 8 | 7.16(1H, bs) | 94.19 |
| 9 | | 152.63 |
| 10 | | 107.48 |
| 11 | 4.95(2H, d, J=7.0) | 69.73 |
| 12 | 5.54(1H, tq, J=7.0 & 1.0) | 118.84 |
| 13 | | 143.02 |
| 14 | 1.69(3H, d, J=1.0) | 16.65 |
| 15 | 2.10(2H, m) | 39.47 |
| 16 | 2.10(2H, m) | 26.19 |
| 17 | 5.07(1H, m) | 123.47 |
| 18 | | 130.00 |
| 19 | 1.60(3H, s) | 17.68 |
| 20 | 1.68(3H, s) | 25.65 |
| 2' | 7.60(1H, d, J=2.5) | 144.85 |
| 3' | 6.96(1H, dd, J=2.5 & 1.0) | 105.05 |

(a) CHCl₃ as 7.26ppm (CDCl₃, 270MHz)(b) ¹³CHCl₃ as 77.0ppm (CDCl₃, 67.5MHz)

{0013}

[表3]

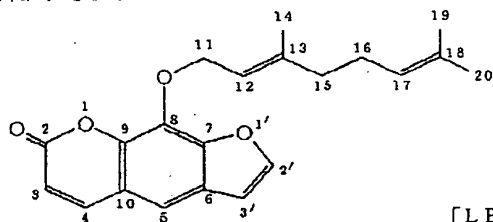
7
LE-III: 5-geranoxo-7-methoxycoumarin

| | ¹ H NMR (a) | ¹³ C NMR (b) |
|-----|---------------------------|-------------------------|
| 2 | | 161.63 |
| 3 | 6.15(1H, d, J=9.5) | 110.76 |
| 4 | 8.01(1H, dd, J=9.5 & 0.5) | 139.04 |
| 5 | | 156.25 |
| 6 | 6.29(1H, d, J=2.0) | 95.78 |
| 7 | | 163.59 |
| 8 | 6.41(1H, dd, J=2.0 & 0.5) | 92.67 |
| 9 | | 156.82 |
| 10 | | 104.25 |
| 11 | 4.60(2H, d, J=6.5) | 65.69 |
| 12 | 5.48(1H, tq, J=6.5 & 1.0) | 118.47 |
| 13 | | 142.12 |
| 14 | 1.75(3H, bs) | 16.71 |
| 15 | 2.12(2H, m) | 39.47 |
| 16 | 2.12(2H, m) | 26.20 |
| 17 | 5.09(1H, m) | 123.56 |
| 18 | | 131.96 |
| 19 | 1.61(3H, s) | 17.70 |
| 20 | 1.68(3H, s) | 25.63 |
| OMe | 3.85(3H, s) | 55.74 |

(a) CHCl₃ as 7.26ppm (CDCl₃, 270MHz)

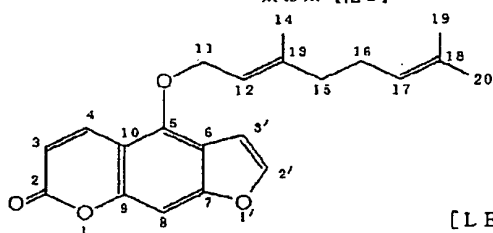
(b) ¹³CHCl₃ as 77.0ppm (CDCl₃, 67.5MHz)

【0014】これらの結果から、LE物質の構造決定を * -geranoxo-7-methoxycoumarin と同定された (化学構造式は化6に示される)。
 行い、LE-Iは8-geranoxypsoralen と同定され (化学構造式は化4に示され)、LE-II 【0015】
 n と同定され (化学構造式は化4に示され)、LE-III は5-geranoxypsoralen と同定され 30 【化4】
 (化学構造式は化5に示され)、そしてLE-IIIは5*



【0016】

※40※ 【化5】

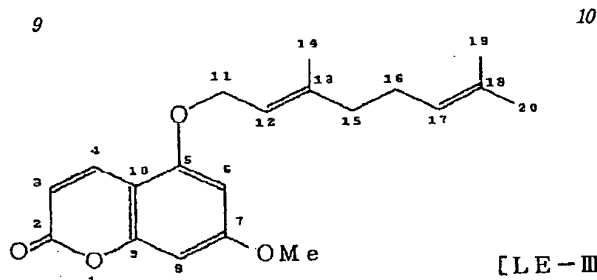


【0017】

【化6】

(6)

特開平7-25764



[LE-III]

【0018】

【実施例2】LE物質の虫歯及び歯周病菌に対する抗菌活性を次のようにして測定、確認した。

【0019】虫歯については、原因菌として知られる *Streptococcus mutans* ATCC 7270 を用いた。歯周病については、歯肉炎と歯槽膿漏の原因菌を用いた。すなわち、歯肉炎の原因菌としては、*Prevotella intermedia* 及び *Actinomyces viscosus* NIAH 1010 を用い、歯槽膿漏の原因菌としては、*Porphyromonas gingivalis* 381 を用いた。そして、*S. mutans* 及び *A. viscosus* の増殖培地としては、ブレインハートインフュージョン (BHI) 培地を用い、また、*P. intermedia* 及び *P. gingivalis* の増殖培地としては、ガム (GAM) 培地を用いた。

【0020】これら菌類に対するLE物質の増殖阻害活*

虫歯・歯周病原菌に対する抗菌活性、最小阻害濃度 (MIC) について

| | <i>S. mutans</i> | <i>P. intermedia</i> | <i>A. viscosus</i> * | <i>P. gingivalis</i> |
|--------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| LE-I | 50ppm | 50ppm | >100ppm | 100ppm |
| LE-II | 50ppm | 50ppm | >100ppm | 75ppm |
| LE-III | 25ppm | 50ppm | >100ppm | 25ppm |

* *A. viscosus* については、LE-I, II, IIIともに100ppmで滅菌は見られなかったが、接種時より菌の減少が見られ、同菌の増殖効果 (制菌効果) が認められた。

【0023】

【実施例3】LE物質の果実貯蔵時に発生するカビに対する増殖阻害活性を次のようにして測定、確認した。

【0024】試験カビは、カビが発生した貯蔵レモン果実から分離した。そして、緑カビ病の *Penicillium digitatum*、青カビ病の *Penicillium italicum* の混在した胞子を得た。増殖培地は、ポテトデキストロース寒天培地を用いた。

【0025】これらカビ類に対するLE物質の増殖阻害活性の測定は、これら3種類のサンプルを添加した寒天

10*性の測定は、これら3種類のサンプルを添加したブイオン培地5mlに菌を 10^5 cells/ml接種して、37℃で2日間培養して行った。但し、*P. gingivalis* については、本菌が偏性嫌気性菌であるため、嫌気ジャー (BBL製) 内で培養した。その後、培養液を寒天培地に0.1ml添加し、これを37℃、2日間培養した後、コロニーの有無を観察した。

【0021】抗菌性は、コロニー無しの場合に滅菌と判断した。そして、サンプル濃度と抗菌効果の相関を調べ、活性の強さは、最小の濃度で同菌を滅菌する最小阻害濃度 (MIC) で示した。また、LE-I, II, IIIは、メタノールに溶かし、添加量のメタノールは菌の増殖に影響がないことを確認した。結果を下記表4に示す。

【0022】

【表4】

培地5mlをシャーレに作成し、シャーレ中心に径2ミリの穴を開けた。そこに、 10^5 spores/mlのカビ胞子を等量 (5μl) ずつ接種して25℃、3~7日間培養した。生長したカビの菌糸の円径を測定し、増殖の程度を観察した。LE-I, II, IIIは、メタノールに溶かし、添加量のメタノールはカビの増殖に影響がないことを確認した。結果を下記表5に示す。

【0026】

【表5】

(7)

特開平7-25764

| 11 | 12 | | |
|-----------------|-----|-----|-----|
| | 3 日 | 5 日 | 7 日 |
| 無 添 加 | + | ++ | +++ |
| 0.05% L E - I | - | + | ++ |
| 0.05% L E - II | - | + | ++ |
| 0.05% L E - III | - | + | ++ |

- 径 5 ミリ未満
 + 径 5 ミリ以上 ~ 15 ミリ未満
 ++ 径 16 ミリ以上 ~ 25 ミリ未満
 +++ 径 25 ミリ以上

【0027】

【発明の効果】本発明の抗菌剤は柑橘類の果皮から抽出されたもので、安全性がきわめて高く、青果物の防カビに使用して有効である。また、虫歯菌、歯周病菌増殖阻害活性も高いので、例えば、歯みがき、口内清浄剤、各

種食品等に適宜添加することができる。

【0028】また、本発明によって抗菌剤の構造決定がなされたので、これらの化合物の誘導体を製造することにより更に新規な抗菌剤の創製も期待できる。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.³
 // C07D 493/04

識別記号 庁内整理番号
 106 C

F I

技術表示箇所